

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 11 月 25 日 (25.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/100965 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 31/7125, 48/00,  
47/48, 47/36, A61P 37/04, C08B 37/00(MATSUMOTO, Takahiro) [JP/JP]; 〒811-0201 福岡県  
福岡市 東区筥松 3-1 3-1 7-1 O 1 Fukuoka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/006793

(74) 代理人: 筒井 知 (TSUTSUI, Satoru); 〒812-0011 福岡  
県 福岡市 博多区博多駅前 3-3 0-1 5 ライオンズ  
マンション博多 9 0 6 号 Fukuoka (JP).

(22) 国際出願日: 2004 年 5 月 13 日 (13.05.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-136876 2003 年 5 月 15 日 (15.05.2003) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立  
行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND  
TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉  
県 川口市 本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 水 雅美 (MIZU, Masami) [JP/JP]; 〒599-8128  
大阪府 堺市 中茶屋 7 4-1 O Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 新海 征治  
(SHINKAI, Seiji) [JP/JP]; 〒811-0201 福岡県 福岡  
市 東区三苫 2-1 3-1 7 Fukuoka (JP). 櫻井 和  
朗 (SAKURAI, Kazuo) [JP/JP]; 〒670-0033 兵庫県  
姫路市 西新町 1 1 7-7 Hyogo (JP). 甲元 一也  
(KOMOTO, Kazuya) [JP/JP]; 〒807-0804 福岡県 北  
九州市 八幡西区 医学生ヶ丘 8-1 1 Fukuoka (JP). 沼田  
宗典 (NUMATA, Munenori) [JP/JP]; 〒813-0035 福岡県  
福岡市 東区松崎 3-1 3-7 Fukuoka (JP). 松本 貴博(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可  
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,  
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,  
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,  
IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,  
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受  
領の際には再公開される。2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: IMMUNOSTIMULANT

(54) 発明の名称: 免疫刺激剤

(57) Abstract: An immunostimulant of a novel type which is a complex of an immunostimulant oligonucleotide with a carrier having a high safety and a high transfection effect. A complex comprising an immunostimulant oligonucleotide and a polysaccharide having a  $\beta$ -1,3-bond (preferably a  $\beta$ -1,3-glucan such as schizophyllan) is formed and then administered as an immunostimulant. Preferable examples of the immunostimulant oligonucleotide include a nonmethylated CpG motif. As the polysaccharide, it is favorable to use one modified with a nucleic acid-binding and/or cytophilic functional group.(57) 要約: 免疫刺激性オリゴヌクレオチドが、安全でトランスフェクション効果の高いキャリアーと複合体化された新しいタイプの免疫刺激剤を開示している。免疫刺激性オリゴヌクレオチドを  $\beta$ -1,3-結合をもつ多糖類(好ましくは、シゾフィランのような  $\beta$ -1,3-グルカン)と複合体化し、免疫刺激剤として投与する。免疫刺激性オリゴヌクレオチドの好ましい例は非メチル化 CpG モチーフを含むものである。多糖類は核酸結合性および/または細胞親和性官能基で修飾したものを使用するのが好ましい。

Best Available Copy

Best Available Copy



WO 2004/100965 A1

## 明 細 書

免疫刺激剤技術分野

- 5      本発明は、免疫刺激剤（Immunostimulant：免疫賦活剤または免疫促進剤などとも呼ばれる）の技術分野に属し、特に、免疫性オリゴヌクレオチドを、新規なトランスフェクション剤と複合体化することにより得られる、安全で、薬効の高い免疫刺激剤を提供することに関する。

背景技術

- 10      免疫応答の刺激活性を有するオリゴヌクレオチド（以下、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、免疫刺激性核酸または免疫刺激性 DNA と記述することがある）は、1984 年に Tokunaga らにより BCG の抗腫瘍性成分を検索する過程で発見された。そして、その活性化作用がシトシン・グアニン ジヌクレオチド（5'-CpG-3'：所謂 CpG 配列）を含む特定の塩基配列に起因するものであることが明らかにされた（Tokunaga, T., et al., J. Natl. Cancer Inst., 72, 955（1984）（非特許文献 1）；Tokunaga, T., et al., J. Natl. Cancer Res., 79, 682（1988）（非特許文献 2））。

- 15      脊椎動物または植物以外の CpG 配列をもつゲノム DNA にも同様の活性が認められている。免疫刺激活性には CpG コアの前後の配列も重要と考えられ、特に、メチル化されてない CpG を有し、その前後に置換プリン（Pu）と置換ピリミジン（Py）が配列した 5'-PuPuCpGPyPy-3'が、代表的な非メチル化 CpG モチーフとしてコンセンサスを得ている（Krieg, A., et al., Nature, 374, 576（1995）（非特許文献 3））。ここで、非メチル化 CpG モチーフとは、よく知られているように、少なくとも 1 つのシトシン（C）-グアニン（G）配列を含む短いヌクレオチド配列（一般的には 4～10 個のヌクレオチドから成る配列）であって、該
- 20      シトシン-グアニン配列におけるシトシンの 5 位がメチル化されていないものを指称する。なお、以下の説明において、CpG とは、特にことわりなく限り非メチ

ル化 CpG を意味する。

有用な CpG モチーフ（ヘキサマー）の例を以下に記載する（ただし、A：アデニン、G：グアニン、C：シトシン、T：チミン、U：ウラシル）。

AACGTT、AGCGTT、GACGTT、GGCGTT、AACGTC、AGCGTC、GACGTC、  
5 GGCGTC、AACGCC、AGCGCC、GACGCC、GGCGCC、AACGCT、AGCGCT、  
GACGCT、および GGCGCT

これらの配列を含む 8～100 個程度で構成されるオリゴヌクレオチドが免疫刺激活性を有するものである（特表 2001-503254（特許文献 1））。

以下の配列は、NK 細胞の活性化に有効と報告された CpG モチーフを含む免疫  
10 刺激性オリゴヌクレオチドの例である（下線部分が CpG モチーフを示し、また、  
大文字はチオール化 DNA を表わす）（伊保澄子、山本三郎、Annual Review 免疫  
2001,137-146（2002）（非特許文献 4））。

accgataaccggtgccggtgacggcaccacg  
accgatagacgctgccggtgacggcaccacg  
15 accgatgacgtcgccggtgacggcaccacg  
accgattcgcgagccggtgacggcaccacg  
ggggggggggggcgatcggggggggggggg  
ggggggggggggacgatcgtcggggggggggg  
ggggggggggggaaacgttggggggggggggg  
20 GAGAACGCTCGACCTTCGAT  
TCCATGACGTTCCTGATGCT  
TCTCCAGCGTGCGCCAT  
GGggtcaacgttgaGGGGGg

CpG モチーフ以外にも、免疫刺激性核酸として知られている幾つかの配列があ  
25 る。例記すると、5'TTTT3'のようにチミジンに富む T リッチ核酸、5'GGGG3'の  
ようにグアニジンに富む G リッチ核酸、チミジンとグアニジンの両方に富む T G

リッチ核酸、シチジンに富む C リッチ核酸などが非 CpG 免疫刺激性核酸として最近注目されている（特表平 08-500738（特許文献 2）；特表 2002-512599（特許文献 3）；特表 2003-510282（特許文献 4）；特表 2003-510290（特許文献 5））。

- 5 これらの免疫刺激性核酸の免疫系細胞に対する効果の大きな特徴は、抗原提示細胞を活性化することである。マウスやヒトの単球、マクロファージ、樹状細胞などに直接作用して、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、IFN $\alpha/\beta$ 、IL-18、一酸化窒素などの免疫力増強作用をもつサイトカインを産生させる。

- 10 免疫性疾患に対する治療用の核酸ならびに DNA ワクチンの組成物に関する特許出願が、最近、増えており、例えば、ザ ユニバーシティ オブ アイオワ リサーチ ファウンデーションの出願によるものは、ウイルス、細菌、真菌または寄生体の感染によって引き起こされる免疫系不全や、ガンにかかっているヒトや動物の処置、リポ多糖やエンドトキシンの暴露から生ずる気流の急性減少を起こした被験体のための治療的使用などのため、またはアジュバント用に多数の CpG モチーフ系の配列を提案している（特表平 10-506265（特許文献 6）；特表 2001-503267（特許文献 7）；特表 2001-513776（特許文献 8））。

CpG モチーフを DNA ワクチンに使用する特許の出願で、魚介類に対するものも認められる（特開平 9-285291（特許文献 9））。

- 20 同様に、動物のパルボウイルスの感染予防の目的のためのものもある（特表 2000-509976（特許文献 10））。

また、特許文献 1、11 および 12 などにも、免疫刺激活性を有する類似の配列が多数記載されている（特表 2002-517156（特許文献 11）；特表 2002-526425（特許文献 12））。

- 25 アンチセンス DNA を用いる遺伝子治療の場合と同様に、免疫刺激性オリゴヌクレオチドのリン酸バックボーンは、ヌクレアーゼ耐性化のために、ホスホジエステル結合の部分がホスホロチオエート結合に修飾されている例が多い。また、

免疫刺激性オリゴヌクレオチドの細胞との親和性を高める目的でリポソーム、カチオン脂質、コレステロールなどのトランスフェクション剤を併用する例も多く見られる。

- 遺伝子治療の際のアンチセンス DNA のトランスフェクション剤としては、当初、レトロウイルスまたはアデノウイルスが *in vitro* で極めて見込みのある結果を与えたが、これら天然由来のウイルスの炎症性、免疫原的性質、ならびに突然変異誘発および細胞ゲノム中への組み込みの危険性が原因して、これらの *in vivo* における使用は制限されている (Mulligan, *Science*, **260**, 926-932 (1993) (非特許文献 5) ; Miller, *Nature*, **357**, 455-460 (1992) (非特許文献 6) ; Crystal, *Science*, **270**, 404-410 (1995) (非特許文献 7))。

天然由来の遺伝子のトランスフェクション剤の代替物として、ウイルス系よりも取り扱いが簡単であるのみならず、細胞へ DNA を確実に効率良く集中させることが可能な人工材料の非ウイルス系キャリアーの使用が提示された (Tomlinson and Rolland, *J. Contr. Rel.*, **39**, 357-372 (1996) (非特許文献 8))。

- 現在、非ウイルス性の人工キャリアーとしてよく検討されているのはポリエチレンイミン (PEI) である。多数の異なった付着細胞および浮遊細胞ライン中では、3 次元的分岐構造のカチオンポリマーである PEI は、ある場合には平均以上のトランスフェクション率を引き起こす結果になった (Boussif et al., *Gene Therapy*, **3**, 1074-1080 (1996) (非特許文献 9))。

- また、PEI と同様、窒素を含む置換基で修飾された、種々のカチオン性ポリマー、カチオン性脂質などが遺伝子キャリアー、トランスフェクション剤、薬物担体などという名称で、最近、多数の特許が出願されるようになってきた。

- しかしながら、PEI のようなカチオン性ポリマーの安全性についてはほとんど確認されていないのが現状である。カチオン性を付与するには、通常、アミノ基の存在が不可欠であるが、アミノ基を有する物質は生理活性が高く、体内毒性等の危険性が考えられる。事実、今まで検討されたいかなるカチオン性ポリマーも

未だ実用に供されておらず、医薬品添加物辞典等に記載されていない（医薬品添加物辞典（非特許文献 10）；日本医薬品添加剤協会編集、薬事日報社（非特許文献 11））。

一方、筋肉内注射製剤の臨床薬として実際に使用されている多糖類に、 $\beta$ -1, 3-グルカンが存在する。この多糖は天然では三重螺旋構造をとっていることが古くから知られている（Theresa M. McIntire and David A. Brant, J. Am. Chem. Soc., 120, 6909（1998）（非特許文献 12））。

さらに、この多糖は、既に生体内での安全性が確認されており、婦人科癌に対する免疫増強法の筋肉内注射薬として 20 年以上の使用実績がある（清水, 陳, 荷見, 増淵, Biotherapy, 4, 1390（1990）（非特許文献 13）；長谷川, Oncology and Chemotherapy, 8, 225（1992）（非特許文献 14））。

このような  $\beta$ -1, 3-グルカンを、DNA 等の生体材料とコンジュゲートし、遺伝子キャリアーに使用できることが知られている。この先行技術には、天然の  $\beta$ -1, 3-グルカン、すなわち、三重螺旋構造を有する  $\beta$ -1, 3-グルカンをもそのまま使用し、これと生化学活性のある材料を、共有結合を介して、 $\beta$ -1, 3-グルカン／生体材料のコンジュゲートを製造する方法が述べられている（PCT/US95/14800）（特許文献 13）。

また、最近、本発明者らにより、 $\beta$ -1, 3-結合を主鎖とする多糖類が、人工的に処理されることで、各種の核酸と新しいタイプの複合体を形成することが見出された（PCT/JP00/07875（特許文献 14）；PCT/JP02/02228（特許文献 14）；櫻井, 新海, J. Am. Chem. Soc., 122, 4520（2000）（非特許文献 15）；木村, 甲元, 櫻井, 新海, Chem. Lett., 1242（2000）（非特許文献 16））。

本発明の目的は、免疫刺激性オリゴヌクレオチドを、安全でトランスフェクション効果の高い新タイプのキャリアーと複合体化し、免疫刺激剤として提供することにある。

#### 発明の開示

本発明者は、 $\beta$ -1,3-結合を保有する多糖類をキャリアー（トランスフェクション剤）として用いることにより、免疫刺激性オリゴヌクレオチドの作用を高め、免疫力増強に優れた安全な免疫刺激剤が得られることを見出した。

かくして、本発明に従えば、免疫刺激性オリゴヌクレオチドと  $\beta$ -1,3-結合を  
5 有する多糖類との複合体から成る免疫刺激剤が提供される。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、カチオン性官能基を導入する場合を例にして、本発明で用いられる修飾多糖の合成スキームの例を示す。

第2図は、本発明で用いられるペプチド R8 および RGD のアミノ酸配列を示  
10 す。

第3図は、本発明で用いられるペプチド修飾シゾフィラン（R8-SPG および RGD-SPG）の合成スキーム例を示す。

第4図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィラン、アミノ基修飾シゾフィラン、アルギニン修飾シゾフィラン、コレステロール修飾シゾフィラン、R8 修飾  
15 シゾフィラン、および RGD 修飾シゾフィランと CpG DNA との複合体化を示すアガロースゲル電気泳動パターンを示している。

第5図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた CpG DNA の刺激によるマウス由来腹腔内マクロファージからのサイトカイン IL-12 産生量の増強効果の結果を示す。

20 第6図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた non-CpG DNA（CpG モチーフを含まないオリゴヌクレオチド）によるマウス由来腹腔内マクロファージからのサイトカイン IL-12 産生効果の結果を示す。

25 第7図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた CpG DNA の刺激によるマウス由来マクロファージ様細胞 J774.A1 からのサイトカイン IL-12 産生量の増強効果の結果を示す。

第 8 図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた CpG DNA の刺激によるマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-6 産生量の増強効果の結果を示す。

第 9 図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた CpG DNA の刺激によるマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-12 産生量の増強効果の結果を示す。

第 10 図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた non-CpG DNA によるマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-6 産生効果の結果を示す。

第 11 図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた non-CpG DNA によるマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-12 産生効果の結果を示す。

第 12 図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた CpG DNA(PO) (ホスホジエステル結合を持つ CpG DNA) の刺激によるマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-6 産生量の増強効果の結果を示す。

第 13 図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた CpG DNA(PO) の刺激によるマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-12 産生量の増強効果の結果を示す。

第 14 図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた non-CpG DNA(PO) (ホスホジエステル結合を持ち、CpG モチーフを含まないオリゴヌクレオチド) によるマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-6 産生効果の結果を示す。

第 15 図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた non-CpG DNA(PO) によるマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-12 産生効果の結果を示す。



第 16 図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた CpG DNA によるマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-4 産生効果の結果を示す。

5 第 17 図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた CpG DNA(PO)によるマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-4 産生効果の結果を示す。

第 18 図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた non-CpG DNA によるマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-4 産生効果の結果を示す。

10 第 19 図は、本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた non-CpG DNA(PO)によるマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-4 産生効果の結果を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明では、免疫刺激性オリゴヌクレオチドを主たる薬剤として使用する。ここで、本発明で用いられる免疫刺激性オリゴヌクレオチドとは、免疫応答を刺激し免疫力の増強に活性を有するオリゴヌクレオチドであり、前記文献に記載されているような各種のオリゴヌクレオチドが例示されるが、それらに限定されるものではない。本発明において対象となる免疫刺激性オリゴヌクレオチドとしては、前記文献に記載されているような、各種の非メチル化 CpG モチーフを含むものが好ましく使用される。また、同様に例示した、非 CpG 免疫刺激性オリゴヌクレオチド（非メチル化 CpG モチーフ以外の免疫刺激性オリゴヌクレオチド）も使用することができる。非 CpG 免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、単独または CpG モチーフと組み合わせて使用される。投与されるこれらのオリゴヌクレオチドはマクロファージなどの免疫細胞に作用し、サイトカインの産出等を介して免疫力を高める効果がある。

25

本発明で使用するオリゴヌクレオチドのリン酸バックボーンは、ヌクレアーゼ

耐性を増すために、主鎖のホスホジエステル結合の部分をホスホロチオエートまたはホスホロジチオエート修飾したものが、通常、用いられるが、ホスホジエステル結合が一部または全部保持されたものでも差し支えない。

本発明の免疫刺激剤は、上述のような免疫刺激性オリゴヌクレオチドと、  
5 1,3-結合を有する多糖類との複合体から、形成され、ここで該多糖類がトランスフェクション剤となる。ここで、本発明で用いられる $\beta$ -1,3-結合を有する多糖類として好ましいのは、 $\beta$ -1,3-グルカンまたは $\beta$ -1,3-キシランである。中でも、シゾフィラン、レンチナン、スクレログルカン、カードラン、パーキマン、グリホラン、またはラミナランから選ばれた $\beta$ -1,3-グルカンが好適であり、特  
10 に、シゾフィラン、レンチナンまたはスクレログルカンのように、1,6-グルコピラノシド分枝を多く含有する(側鎖率 33~40%) $\beta$ -1,3-グルカンが好ましい。

本発明で用いられる上記のごとき多糖類は、天然のままでも使用可能であるが、核酸結合性および／または細胞膜親和性官能基で修飾されたものがトランスフェク  
15 ション能の点でより適当である。ここで、核酸結合性とは、核酸と相互作用して多糖類と当該核酸との結合を向上させる性質を指称する。また、細胞膜親和性とは、細胞膜タンパク質や細胞膜脂質(リン脂質)と親和性のあることを指称する。本発明においては、このような核酸結合性および細胞膜親和性のいずれか一方または両方の性質を発揮するような官能基で修飾した多糖類を用いることが好  
20 ましい。本発明で使用されるのに特に好適な核酸結合性および／または細胞膜親和性官能基の例として、カチオン性官能基、ステロイド性官能基、塩基性アミノ酸性官能基およびペプチド性官能基を挙げることができる。

カチオン性官能基とは正電荷を有する官能基であり(その具体例については後述の実施例 2 参照)、多糖類にカチオン性官能基が付与されることにより、DNA  
25 や RNA のような核酸の持つ負電荷と静電的相互作用により多糖と核酸との結合を高める。ステロイド性官能基(具体例については実施例 4 参照)は、ステロイド骨格にスペーサーを介して結合しているアミノ基の正電荷に因る核酸結合性と、

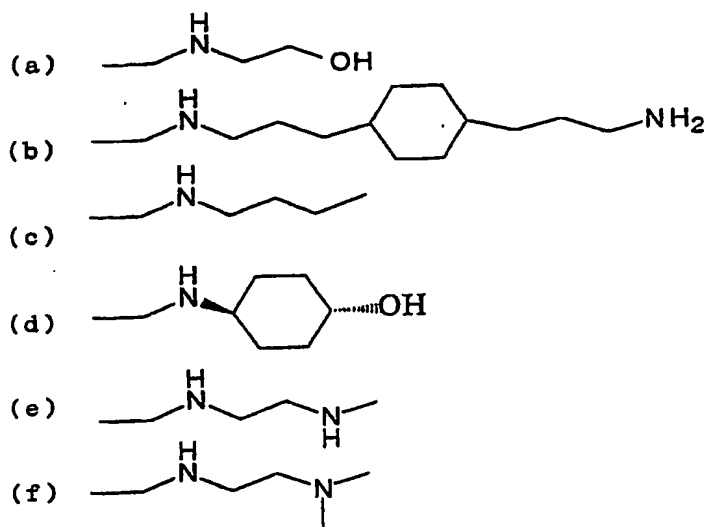
ステロイド骨格のもつ細胞膜親和性との効果が期待されるものである。塩基性アミノ酸性官能基（具体例については実施例3参照）は、アミノ酸のアミノ基の正電荷に因る核酸結合性と、塩基性アミノ酸残基のもつ細胞膜親和性との効果が期待されるものである。ペプチド性官能基とは、例えば、後述の実施例5～7に示

- 5   す R8 や RGD のように、主として細胞膜親和性による効果で核酸のトランスフ  
    ェクション能を促進するアミノ酸配列を含むペプチド鎖である。多糖類を修飾し  
    て、以上のような核酸結合性および／または細胞膜親和性官能基を付与する方  
    法としては、通常の有機化学の手法であればよいが、一般的には、多糖の 1,6-グ  
10   ルコピラノシド分枝を過ヨウ素酸酸化した後、還元的アミノ化を行うことにより  
    該当する官能基を結合させる（第1図参照）。これらの事項については、本発明  
    者らによる PCT/JP02/02228（特許文献15）にも詳述されているが、以下に  
    その要旨を再説する。

- 既述のように、本発明の免疫刺激剤を構成する修飾多糖を得るために、核酸結  
    合性官能基および／または細胞膜親和性官能基を多糖に付与するには、一般に、  
15   多糖の 1,6-グルコピラノシド分枝を過ヨウ素酸酸化した後、還元的アミノ化を行  
    なう。

    したがって、本発明で用いられる修飾多糖を形成する核酸結合性官能基および  
    細胞膜親和性官能基は、還元的アミノ化が適用されるような一級アミン、二級ア  
    ミンまたはヒドラジンを有する化合物由来のものである。

- 20   例えば、本発明で用いられるのに好適なカチオン性官能基としては、下記に示  
    すような1級もしくは2級のアミノ基を少なくとも1つ含む鎖状または環状の化  
    合物由来のものであるが、無論これらに限定されるものではない。これらは、市  
    販のアミノ基をもつ化合物から容易に合成することができる。



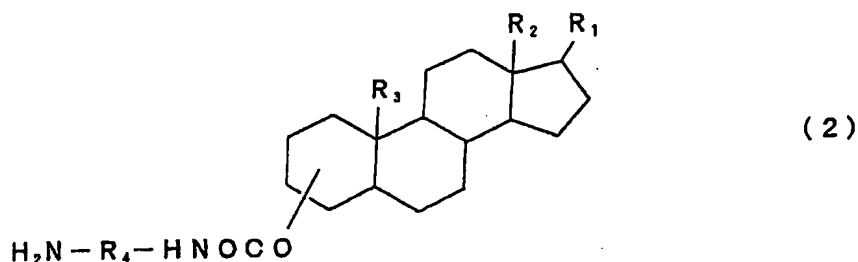
第1図は、核酸結合性官能基としてカチオン性官能基（上記（a）で示すもの）を導入する場合を例に、本発明で用いるカチオン性修飾多糖を得る方法を示す。

図中（i）は過ヨウ素酸での酸化を示し、（ii）はシッフ塩基の形成を示し、（iii）

- 5 はシッフ塩基の水素化ホウ素ナトリウムによる還元を示す。未反応の3位水酸基を含む側鎖を有する $\beta$ -1, 3-グルカンの場合は、2.X、3.X、4.Xで表わされる反応物が得られる。5と6は、この反応が、側鎖の一部に起こることを示す。

また、本発明に従い、過ヨウ素酸酸化に引き続く還元的アミノ化により本発明の多糖の分枝に付加されるステロイド性官能基として好ましいのは、下記の式

- 10 （2）で表わされる化合物のように、ステロイド骨格を有し、該ステロイド骨格にスペーサーを介してアミノ基が結合しているような構造の由来のものである。



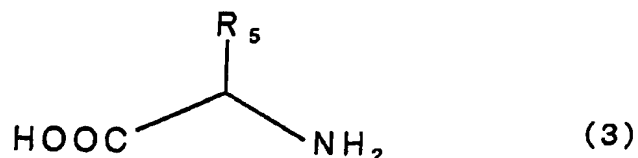
ここで、 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ は水素または炭素、酸素、窒素もしくは水素を含む置換基である。また、 $\text{R}_4$ はスペーサーであり、水素または炭素、酸素、窒素もしくは

は水素を含む環状または直鎖状の化合物由来のものである。R<sub>4</sub> がステロイド骨格に結合する位置はいずれでもよい。また、上記の一般式に当てはまらなくても、ステロイド骨格を有するものはいずれでも使用できる。例えば、コルチコステロン、コルチゾールの誘導体などである。

- 5      このようなステロイド性官能基は、ステロイド環に付加している水酸基にジアミンを結合させた後に、上述した方法に従って、還元的アミノ化法で、β-1, 3-グルカンの分枝にステロイド性官能基を導入する。

本発明で用いられる修飾多糖を得るために、過ヨウ素酸酸化と還元的アミノ化により、多糖の分枝に導入される塩基性アミノ酸性官能基とは、下記の一般式(3)

- 10      で表わされるアミノ酸由来のものである。



ここで、R<sub>5</sub> はアミノ酸の側鎖である。この塩基性アミノ酸は、カルボキシル基および側鎖を保護してから、多糖の分枝に導入する。

- 本発明に従い免疫性刺激オリゴヌクレオチドと多糖類との複合体を調製するには、本発明者らによる PCT/JP02/02228 (特許文献 15) に詳細に記述されている方法に従うのが特に好ましい。すなわち、本来は、天然もしくは水中で三重螺旋として存在する β-1,3-グルカン等の多糖を、極性溶媒(例えば、ジメチルスルホキシド)に溶解して 1 本鎖に解いた後、1 本鎖の核酸を加え、溶媒を水に戻すこと(再生過程)によって、核酸 1 本と多糖 2 本とから成る、三重螺旋状の複合体として使用する(後述の実施例 1 参照)。この複合体は、ヌクレオチド 1 本鎖と多糖 2 本鎖が水素結合と疎水性相互作用を介して三重螺旋状にコンジュゲートした、非共有結合性のものと考えられる。複合体は、通常、水溶液として得られるので、限外ろ過法などの比較的簡単な方法で必要な純度に精製された後、治療用に使われる。
- 15
- 20

## 実施例

以下、具体的な免疫刺激剤としての調製法、得られた免疫刺激剤のキャラクタリゼーションおよび *in vitro* 試験における投与の方法と評価に関して本発明の特徴を実施例において詳細に示すが、これらの実施例は本発明を制限するためのものではない。

### 実施例 1

$\beta$ -1,3-グルカン (シゾフィラン) および非メチル化 CpG モチーフを含むオリゴヌクレオチド (CpG DNA) を複合体化した免疫刺激剤の調製 三重螺旋構造のシゾフィランを文献記載の定法に従って製造した。すなわち、ATCC (American Type Culture Collection) から入手した *Schizophyllum commune* Fries (ATCC 44200) を、最小培地を用いて 7 日間静置培養した後、細胞成分および不溶残渣を遠心分離して得られた上清を超音波処理して分子量 45 万の三重螺旋シゾフィランを得た。このシゾフィランをジメチルスルホキシド (以下、DMSO と表記) に溶解させて 1 本鎖にし、濃度を 30mg/ml に調整し、この溶液 1  $\mu$ l に、3  $\mu$ l の純水、10mM のトリス緩衝液 (pH7.8) 1  $\mu$ l および 3 mg/ml の CpG DNA 溶液 5  $\mu$ l を混合した。得られた溶液はすべて透明で、均一であった (Gregory G. Martin, et al., Am. Chem. Soc. Polymer Prepr. **38** (1), 253-254 (1997) ; K. Tabata, et al., Carbohydr. Res., **89**, 121-135 (1981))。

使用した CpG モチーフを含むオリゴヌクレオチド (固相合成品) は、塩基配列内に一箇所、シトシン・グアニン ジヌクレオチド (CpG) の配列を含みホスホロチオエート結合をもつ TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT の 3'末端に 40 の dA をつけたシーケンス (配列番号 1) を CpG DNA とした (Y. Aramaki, et al. Biol. Pharm. Bull., 25(3) 351-355(2002))。

### 実施例 2

カチオン性誘導体の合成 (アミノ基修飾シゾフィラン) およびキャラクタリゼーション 第 1 図のスキームに従い、カチオン性誘導体 (カチオン性官能基で修飾

された多糖)を合成した。アミノ基の導入率の制御は過ヨウ素酸酸化に使用する過ヨウ素酸ナトリウムの当量数により制御することが可能である。従って、あらゆる導入率に対して合成法には相違は生じない。ここでは、シゾフィランへ 4.6、17、20 および 36%のアミノ基を導入したカチオン修飾シゾフィランの合成例を示す。また、導入するアミノ基として 2-アミノエタノールおよびスペルミンを使用した。アミノ基の導入率は側鎖グルコースに対する過ヨウ素酸ナトリウムの当量数によって制御することが可能であり、その実験結果は実施例 3 に示した。実施例 1 に記された方法にて分子量 45 万のシゾフィランを得た。このシゾフィラン 100 mg を水 100 ml に溶解させた。そこへ過ヨウ素酸ナトリウム水溶液(シゾフィラン側鎖グルコースに対して 10%および 40%、80%の当量数若しくは、過剰量である 500%)をゆっくりと加え、4℃で 2 日間攪拌した。反応溶液を透析膜(排除限界 12000)で透析後、凍結乾燥した。得られた白色個体をジメチルスルホキシド 20 ml に溶解させ、2-アミノエタノールおよびスペルミン、2ml (大過剰、10000 当量以上)を加え、室温で 2 日間攪拌を続けた。過剰の水素化ホウ素ナトリウムを酢酸で失括させた後、反応溶液を透析膜(排除限界 12000)で透析(酸性水溶液、塩基性水溶液、蒸留水)し、凍結乾燥することでカチオン性誘導体を調製した。

アミノ基の導入率の決定については元素分析による窒素の微量分析(検出下限 0.05%)により行った。窒素の微量分析実験は全て 3 回の測定を行った結果を表 1 に示した。また、分子量についてはゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)および粘度測定から検討し、原料と一致した分子量を示すことを明らかにした。

表 1

過ヨウ素酸の当量数 (%)	10	40	80	500
アミノ基の導入率 (%)	4.6 - 4.7	16.3 - 17.8	19.3 - 20.8	35.2 - 37.4

### 実施例 3

アミノ酸誘導体の合成（アルギニン修飾シゾフィラン）およびキャラクタリゼーション 第 1 図のスキームに従い、アミノ酸誘導体（アミノ酸性官能基で修飾された多糖）を合成した。アミノ酸の導入率の制御は実施例 2 と同様の方法で制御

5 した。ここでは、シゾフィランへ 4.6、17、20、および 36%のアルギニンを導入したアルギニン修飾シゾフィランの合成例を示す。

実施例 1 に記された方法にて分子量 45 万のシゾフィランを得た。このシゾフィラン 100mg を水 100ml に溶解させた。そこへ過ヨウ素酸ナトリウム水溶液（シゾフィラン側鎖グルコースに対して 10、40 および 70%の当量数）をゆっくりと

10 加え、4℃で 2 日間攪拌した。反応溶液を透析膜（排除限界 12000）で透析後、凍結乾燥した。得られた白色個体を DMSO 20ml に溶解させ、アルギニンメチルエステル 2ml（大過剰、10000 当量以上）を加え、室温で 2 日間攪拌を続けた。過剰の水素化ホウ素ナトリウムを酢酸で失活させた後、反応溶液を透析膜（排除

15 とでアルギニン修飾シゾフィランを調製した。

アルギニンの導入率の決定は、元素分析による窒素の微量分析（検出下限 0.05%）により行った。測定は全て 3 回ずつ行った。結果を表 2 に示した（M. Numata, et al., Bioorg. Chem., 31, 163-171 (2003)）。

表 2

過ヨウ素酸の当量数	アルギニンの導入率
10 %	3.6 %
40 %	9.3 %
70 %	13.5 %

20

### 実施例 4

コレステロール誘導体（コレステロール修飾シゾフィラン）の合成およびキャラ



クタリゼーション 第1図のスキームに従い、コレステロール誘導体（ステロイド性官能基で修飾された多糖）を合成した。コレステロールの導入率の制御は実施例2と同様の方法で制御した。ここでは、側鎖に対して4.5%のコレステロールを修飾したコレステロール修飾シゾフィランの合成法を示す。即ち、実施例1

5 で調製したシゾフィラン 100mg を水 100ml に溶解させ、過ヨウ素酸ナトリウム 1.65mg（側鎖グルコースに対して 5mol%）を加え、遮光下、4℃で2日間撹拌した。反応溶液を透析膜（排除限界 12000）で透析し、凍結乾燥した。

得られた白色固体を DMSO に懸濁させ、アミノ基末端を有するステロイド誘導体（ここでは、Ishii らの文献に従って合成した 3β-コレスト-5-エン-10 3-イル N-(2-アミノエチル)カルバメート）を加え、室温で2日撹拌を続けた。反応溶液に水素化ホウ素ナトリウム 100mg を4時間間隔で2度加え、その後、室温で1日撹拌した。過剰の水素化ホウ素ナトリウムを酢酸で失活させ、反応溶液を透析膜（排除限界 12000）で透析し、凍結乾燥することでコレステロール修飾シゾフィランを得た（Tsutomu Ishii, Ritsuko Iguchi, Erwin Snip, Masato

15 Ikeda and Seiji Shinkai, Langmuir, 17, 5825-5833 (2001)）。

コレステロールの導入率の決定は、元素分析による窒素の微量分析（検出下限 0.05%）により行った。測定は全て3回ずつ行った。結果を表3に示した。

表 3

過ヨウ素酸酸化率	窒素含有率	コレステロールの導入率
5.0 %	0.358~0.383	4.5 %

## 20 実施例 5

結合性官能基を含むペプチドの合成 ペプチド鎖（ペプチド性官能基）によるシゾフィランの化学修飾において、ペプチド鎖にはシゾフィランへの結合性官能基を有していることが必要である。結合性官能基およびスペーサーには特に制約はないが、ここでは、例としてマイケル付加反応によりマレインイミド基へ共有結

合として固定化できるチオールを有するシステインを含むペプチド鎖の合成を以下に示す。

ペプチドの配列としては、細胞膜に対する親和性が高いことが知られているアルギニンオリゴマー（ここでは8量体を合成し、そのペプチド鎖を R8 と表記する：配列番号2）、および、細胞接着因子が認識することで知られているアルギニン-グリシン-アスパラギン酸の配列（RGD と表記する：配列番号3）を含み、N末端にシステインを導入しているペプチド（第2図参照）をそれぞれ合成した。ペプチド鎖は Fmoc 法に従って合成し、精製は HPLC（高速液体クロマトグラフィー）にて行った（精製条件：日立 L-7100、ODS カラム（YMC 社製）、溶離液はアセトニトリル/蒸留水（共に 0.1vol%のトリフルオロ酢酸を含む）= 5/95 を 40 分かけて 20/80 にグラジエントした）。同定は MALDI-TOF MS（マトリックス支援イオン化-飛行時間型質量分析計）にて行い、同定結果は表4に示す（マトリックス：CHCA）（Fmoc 法；「固相合成ハンドブック」、メルク株式会社）。

表4

ペプチド	理論値	実測値
R8	1371.65	1371.20
RGD	450.48	450.40

#### 実施例 6

ペプチド修飾シゾフィランの合成 実施例5にて合成した、ペプチド鎖をシゾフィランへ導入するために第3図に示す合成スキームに従って合成した。反応は、過ヨウ素酸酸化、還元的アミノ化、スペーサーの導入、ペプチドの導入反応の4段階からなる。ペプチドの導入率は過ヨウ素酸酸化反応により制御することが可能である。2、4段階目では反応の進行を元素分析により評価した。結果は実施例7に示す。

実施例1で調製したシゾフィラン 300mg を水 300ml に溶解させ、過ヨウ素酸

ナトリウム水溶液 (9.87mg : シゾフィランの側鎖に対して 0.1 当量 (10%)) を加え、遮光下 4℃で 2 日間攪拌した。反応溶液を透析膜 (排除限界 12000) で透析後、凍結乾燥し、白色固体 1 を得た。

- 得られた白色固体 1 100mg を極性有機溶媒の DMSO 10ml、28%アンモニア水溶液 10ml に溶解させ、シアノ水素化ホウ素ナトリウム 200mg (大過剰) を加え、室温で 4 日間攪拌した。反応溶液を透析膜 (排除限界 12000) で透析後、凍結乾燥し、白色固体 2 を得た。

- 得られた白色固体 2 を DMSO 10ml に溶解させ、3-マレインイミドプロピオン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル 100mg (大過剰) を加え、窒素気流下、室温で 24 時間攪拌した。反応溶液を透析膜 (排除限界 12000) で透析後、凍結乾燥し、白色固体 3 を得た。

- 得られた白色固体 3 を DMSO 5ml に溶解させた。また、実施例 1 にて得られたシステインを含むペプチド鎖 (約 50mg) を蒸留水に溶解させ、先の DMSO 溶液と混合し、その溶液を室温で 2 日間攪拌した。反応溶液を透析膜 (排除限界 12000) で透析後、凍結乾燥し、ペプチド修飾シゾフィランを得た。

#### 実施例 7

- ペプチド修飾シゾフィランのキャラクタリゼーション 実施例 6 にて得られた、ペプチド修飾シゾフィランのキャラクタリゼーション (各反応後の導入率の窒素元素分析による評価、分子量) を行った。表 5 には実施例 6 の各素反応における窒素の元素分析を元にした官能基の導入率 (ペプチド修飾率) の変化を示している。また、分子量はゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) により評価したところ、ペプチドの修飾前後において分子量の大きな変化は起こらないことを確認している (T. Matsumoto, et al., Biochim. Biophys. Acta, 1670, 91-104 (2004))。

表 5

側鎖の酸化率	R8 修飾シゾフィラン		RGD 修飾シゾフィラン	
	5 %	10 %	5 %	10 %
白色固体 2	3.7 ± 0.1 %	9.4 ± 0.1 %	3.7 ± 0.1 %	9.4 ± 0.1 %
白色固体 3	3.7 ± 0.3 %	2.3 ± 0.3 %	3.7 ± 0.3 %	2.3 ± 0.3 %
ペプチド修飾シゾフィラン	0.3 ± 0.1 %	0.5 ± 0.1 %	1.0 ± 0.1 %	1.3 ± 0.3 %

実施例 8

カチオン化シゾフィランおよびアミノ酸修飾シゾフィラン、コレステロール修飾

- 5 シゾフィランならびにペプチド修飾シゾフィランと CpG DNA との複合体化免疫刺激剤の調製 17、20 および 36 % のアミノ基修飾シゾフィラン（以下、N-SPG と表記）、4.6 % のスペルミン修飾シゾフィラン（以下、SP-SPG と表記）、3.6、9.3 および 13.5 % のアルギニン修飾シゾフィラン（以下、Arg-SPG と表記）、4.5 % のコレステロール修飾シゾフィラン（以下、Chol-SPG と表記）、0.3 および 0.5 %
- 10 の R8 修飾シゾフィラン（以下、R8-SPG と表記）、ならびに 1.0 および 1.3 % の RGD 修飾シゾフィラン（以下、RGD-SPG と表記）をそれぞれ DMSO に溶解させて 1 本鎖にし、濃度を 30mg/ml に調整し、それぞれ溶液 1 μl に、純水 3 μl、10mM のトリス緩衝液（pH7.8）1 μl および実施例 1 に記載の CpG DNA 溶液（3 mg/ml）5 μl を混合した。得られた溶液はすべて透明で、均一であった。

- 15 以後、実施例 2、3、4、および 6 にて合成したシゾフィラン類を総称して化学修飾シゾフィランと表記し、各化学修飾シゾフィランは R8(0.3)-SPG というようにかっこ内にその導入率を示す表記であらわす。

実施例 9

CpG DNA とシゾフィラン類との複合体形成のゲル電気泳動法による確認

- 20 CpG DNA は負に帯電したリン酸基が正電荷方向に電気泳動する。さらにゲルマトリックスの網目の隙間を泳動するため CpG DNA がシゾフィランと複合体を形

成することにより分子量が大きくなるほど移動度は減少する。そこで、CpG DNA にシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランを添加して実施例 1 および 8 に記載の方法で複合体を形成させた後、MOPS 緩衝液 (20mM MOPS (pH 7.0)、5mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTA、3%ジメチルスルホキシド) 中で 2%アガロースゲル  
5 用いて 2V/cm で 1 時間電気泳動させ、Gel Star Nucleic Acids Stain (BMA) で染色後、トランスイルミネーター下でその移動度を評価した。

第 4 図に例示したアガロースゲル電気泳動の結果によると、シゾフィランおよび化学修飾シゾフィランの添加に伴って、CpG DNA の移動度は減少しており、複合体の形成が確認された。

#### 10 実施例 10

シゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた CpG DNA の刺激によるマウス由来腹腔マクロファージからのサイトカイン IL-12 産生量の増強効果 マウス由来腹腔マクロファージの単離は、文献記載の定法で行った。すなわち 8 週齢の雌の Balb/c マウスの頸動脈を切断し脱血死させ、70%エタノール  
15 で消毒後に腹部外皮に切れ目を入れ外皮をはいで腹膜を露出させた。冷 PBS (リン酸緩衝化生理食塩水) を 5ml 腹部に注入し、よくマッサージしたのち液を回収した。ポリプロピレン製の遠心管を用いて 1,000 rpm、10 分間、4℃で遠心した。上清を除き 10%仔牛胎児血清を含む RPMI1640 培地に懸濁した (日本生化学会編、新生化学実験講座 12 分子免疫学 I 免疫細胞・サイトカイン、東京化学同人 (1989))。  
20

96 穴プレートに 100  $\mu$ l の 10%仔牛胎児血清を含む RPMI1640 培地に懸濁した  $2 \times 10^5$  個のマウス由来腹腔マクロファージを播種し 37℃、5%CO<sub>2</sub> 下で 2 時間培養してプレートに細胞を接着後に、CpG DNA および実施例 1 と実施例 8 で調製した CpG DNA とシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランとの複合体を限外ろ  
25 過膜 (排除限界 3000) でろ過して DMSO を除去し濃度を再調整したものを添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 下で 24 時間培養後に培養上清を回収した。

培養上清中に含まれるマウスの全 IL-12 量の測定は、Mouse Interleukin-12 Total ELISA (ENDOGEN 社製) を利用し、付属のプロトコールに従って測定した。その測定結果を第 5 図に示した。第 5 図に示したように、培養上清に含まれる全 IL-12 量は、CpG DNA 単独投与よりも CpG DNA とシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランの複合体である本発明の免疫刺激剤の方が、多く含まれていた。この結果、本発明の免疫刺激剤投与により、マクロファージが産生するサイトカイン (IL-12) 量の増加が確認された。

#### 比較例 1

シゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた non-CpG DNA (CpG モチーフを含まないオリゴヌクレオチド) によるマウス由来腹腔マクロファージからのサイトカイン IL-12 産生効果 実施例 10 で用いた CpG DNA の代わりに塩基配列内に、シトシン・グアニン ジヌクレオチド (CpG) の配列を含まない (免疫刺激効果を示さない) ホスホロチオエート結合をもつ TCC ATG AGC TTC CTG ATG CT の 3' 末端に 40 の dA をつけたシークエンスのオリゴヌクレオチド (以下、non-CpG DNA と表記 : 配列番号 4) を用いて、実施例 10 と同様の方法でマウス由来腹腔マクロファージからのサイトカイン IL-12 産生量を評価した。この結果を第 6 図に例示した (Y. Aramaki, et al. Biol. Pharm. Bull., 25(3) 351-355(2002))。

第 6 図に示すように、non-CpG DNA 単独投与およびシゾフィランまたは化学修飾シゾフィランとの複合体投与において、培養上清中のマウスの全 IL-12 量は増加しておらず、培地のみと比較して IL-12 産生量にほぼ同じ程度であった。この結果、免疫刺激効果のないオリゴヌクレオチド (この例では、non-CpG DNA) との複合体形成物は、免疫刺激効果が無い (サイトカインの IL-12 が産生されない) ことが示された。

#### 実施例 11

シゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた CpG DNA の刺

激によるマウス由来マクロファージ様細胞 J774.A1 からのサイトカイン IL-12 産生量の増強効果 実施例 10 で用いたマウス由来腹腔マクロファージの代わりに、免疫刺激物質によって IL-12 産生が増強されることが報告されているマウス由来マクロファージ様細胞 J774.A1 (ATCC より入手) を用いて、実施例 10  
5 と同様の方法でマウス由来腹腔マクロファージからのサイトカイン IL-12 産生量を評価した。この結果を第 7 図に例示した (E. R. Kandimalla, et al., Bioconjugate Chem., 13(5), 966-974(2002))。

第 7 図に例示したように、培養上清に含まれる全 IL-12 量は、CpG DNA 単独投与よりも CpG DNA とシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランの複合体で  
10 ある本発明の免疫刺激剤の方が、多く含まれていた。この結果、実施例 10 に例示したマウス由来腹腔マクロファージと同様に、本発明の免疫刺激剤投与により、マウス由来マクロファージ様細胞 J774.A1 からのサイトカイン (IL-12) 産生量の増加が確認された。

#### 実施例 12

シゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた CpG DNA の刺激によるマウス脾臓細胞からのサイトカイン IL-6 および IL-12 産生量の増強効果 実施例 10 で用いたマウス由来腹腔マクロファージの代わりに、免疫刺激物質によって IL-6 および IL-12 産生が増強されることが報告されているマウス由来脾臓細胞 (脾臓リンパ球) を用いて、マウス由来脾臓細胞からのサイトカイン  
20 IL-6 および IL-12 産生量を評価した。マウス由来脾臓細胞の単離は、文献記載の定法で行った。すなわち 8 週齢の雌の Balb/c マウスを頸椎脱臼にて屠殺し、70% エタノールで消毒後、腹部外皮に切れ目をいれて外皮を剥いで腹膜を露出させる。腹膜を開き脾臓を回収した。脾臓を PBS 中の網 (200 メッシュ) とピンセットでほぐした後、細胞塊を網でこす。細胞浮遊液をポリプロピレン製の遠心管を用い  
25 て 1,000 rpm、10 分間、4℃で遠心した。上清を除き 10% 仔牛胎児血清を含む RPMI1640 培地に懸濁した (日本生化学会編、新生化学実験講座 12 分子免疫

学I 免疫細胞・サイトカイン、東京化学同人（1989））。

96穴プレートに100 $\mu$ lの10%仔牛胎児血清を含むRPMI1640培地に懸濁した  
2.5 $\times 10^5$ 個のマウス由来脾臓細胞を播種し、CpG DNA および実施例1と実施例  
8で調製したCpG DNA とシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランとの複合体  
5 を限外ろ過膜（排除限界3000）でろ過してDMSOを除去し濃度を再調整したも  
のを添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下で24時間培養後に培養上清を回収した。

培養上清中に含まれるマウスのIL-6 および全IL-12量の測定は、Mouse  
Interleukin - 6 ELISA および Mouse Interleukin - 12 Total ELISA

（ENDOGEN社製）を利用し、付属のプロトコールに従って測定した。その測  
10 定結果を第8図および第9図に示した。第8図と第9図に示したように、培養上  
清に含まれるIL-6と全IL-12量は、CpG DNA 単独投与よりもCpG DNA とシ  
ゾフィランおよび化学修飾シゾフィランの複合体である本発明の免疫刺激剤の方  
が、多く含まれていた。この結果、本発明の免疫刺激剤投与により、脾臓細胞（リ  
ンパ球）が産生するサイトカイン（IL-6とIL-12）量の増加が確認された（E. R.  
15 Kandimalla, et al., Bioconjugate Chem., 13(5), 966-974(2002)）。

#### 比較例2

シゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた non-CpG  
DNA によるマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-6 と IL-12 産生効果

実施例12で用いたCpG DNAの代わりにnon-CpG DNAを用いて、実施例12  
20 と同様の方法でマウス由来脾臓細胞からのサイトカインIL-6とIL-12産生量を評  
価した。この結果を第10図と第11図に例示した。

第10図と第11図に示すように、non-CpG DNA 単独投与およびシゾフィラン  
または化学修飾シゾフィランとの複合体投与において、培養上清中のマウスの  
IL-6と全IL-12量は増加しておらず、培地のみと比較してIL-6とIL-12産生  
25 量にほぼ同じ程度であった。この結果、免疫刺激効果のないオリゴヌクレオチド  
（この例では、non-CpG DNA）との複合体形成物は、免疫刺激効果が無いこと



が示された。

### 実施例 13

$\beta$ -1,3-グルカン (シゾフィラン) および化学修飾シゾフィランとホスホジエステル型 CpG DNA (CpG DNA(PO)) との複合体化免疫刺激剤の調製 シゾフ

- 5 イランおよび化学修飾シゾフィランをそれぞれ DMSO に溶解させて 1 本鎖にし、濃度を 30mg/ml に調整し、この溶液 1  $\mu$ l、純水 3  $\mu$ l、10mM のトリス緩衝液 (pH7.8) 1  $\mu$ l と、実施例 1 に記載の CpG DNA 溶液に代わり、CpG DNA(PO)溶液 (3 mg/ml) 5  $\mu$ l を混合した。得られた溶液はすべて透明で、均一であった。

- 10 使用した CpG モチーフを含むオリゴヌクレオチド (固相合成品) は、塩基配列内に一箇所、シトシン・グアニン ジヌクレオチド (CpG) の配列を含みホスホジエステル結合をもつ TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT の 3'末端に 40 の dA をつけたシーケンス (配列番号 5) を CpG DNA(PO)とした。

### 実施例 14

シゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた CpG DNA(PO)

- 15 の刺激によるマウス脾臓細胞からのサイトカイン IL-6 および IL-12 産生量の増強効果 実施例 12 で用いた CpG DNA に実施例 13 に記載の CpG DNA (PO) を用いて、実施例 12 と同様の方法でマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-6 および IL-12 産生量を評価した。この結果を第 12 図および第 13 図に例示した。

- 20 第 12 図および第 13 図に例示したように、培養上清に含まれる IL-6 および全 IL-12 量は、CpG DNA(PO)単独投与よりも CpG DNA(PO)とシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランの複合体である本発明の免疫刺激剤の方が、多く含まれていた。この結果、本発明の免疫刺激剤である CpG DNA(PO)/シゾフィランおよび CpG DNA(PO)/化学修飾シゾフィラン投与により、マウス由来脾臓細胞からの
- 25 サイトカイン (IL6 および IL-12) 産生量の増加が確認された。

### 比較例 3

シゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた non-CpG DNA(PO)によるマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-6 と IL-12 産生効果 実施例 14 で用いた CpG DNA(PO)の代わりに塩基配列内に、シトシン・グアニン ジヌクレオチド (CpG) の配列を含まない (免疫刺激効果を示さない)

- 5 ホスホジエステル結合をもつ TCC ATG AGC TTC CTG ATG CT の 3' 末端に 40 の dA をつけたシーケンスのオリゴヌクレオチド (以下、non-CpG DNA(PO) と表記: 配列番号 6) を用いて、実施例 14 と同様の方法でマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-6 と IL-12 産生量を評価した。この結果を第 14 図と第 15 図に例示した。

- 10 第 14 図と第 15 図に示すように、non-CpG DNA(PO)単独投与およびシゾフィランまたは化学修飾シゾフィランとの複合体投与において、培養上清中のマウスの IL-6 と全 IL-12 量は増加しておらず、培地のみと比較してほぼ同じ程度の産生量であった。この結果、免疫刺激効果のないオリゴヌクレオチド、non-CpG DNA(PO)との複合体形成物は、免疫刺激効果が無い (サイトカインの IL-6 と IL-12 が産生されない) ことが示された。

#### 比較例 4

シゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させた CpG DNA 若しくは CpG DNA(PO)、non-CpG DNA、non-CpG DNA(PO)の刺激によるマウス脾臓細胞からのサイトカイン IL-4 産生効果

- 20 実施例 12 および実施例 14 と同様の方法でマウス由来脾臓細胞からのサイトカイン IL-4 産生量を評価した。この結果を第 16 図から第 19 図に例示した。

- 第 16 図から第 19 図に例示したように、CpG DNA 若しくは CpG DNA(PO)、non-CpG DNA、non-CpG DNA(PO)単独投与およびシゾフィランまたは化学修飾シゾフィランとの複合体投与において、培養上清中のマウスの IL-4 量は増加しておらず、培地のみと比較してほぼ同じ程度の産生量であった。免疫刺激効果のある CpG モチーフは、IL-2 や IL-12、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  等の細胞性免疫 (I 型免疫)
- 25

系サイトカインのみを産生誘導し、IL-4 や IL-5、IL-10、IL-13 等の液性免疫(II 型免疫)系サイトカインを抑制することが報告されている。この結果から、本発明の免疫刺激剤投与により、CpG モチーフによる免疫刺激効果により免疫増強していることが示された (Dennis M. Klinman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 2879-2883(1996))。

5

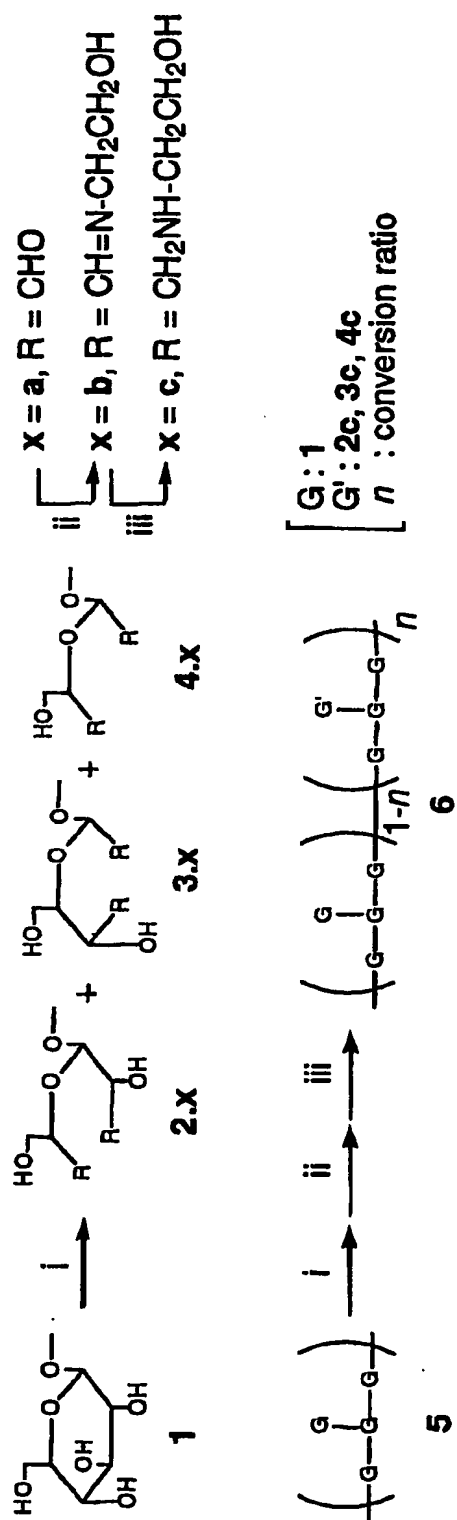
#### 産業上の利用可能性

本発明は、安全性の確認された  $\beta$ -1,3-グルカン等の多糖類をキャリアー（トランスフェクション剤）として用いる安全で優れた免疫増強作用を有し、免疫治療および遺伝子治療等の分野で利用される新しいタイプの免疫刺激剤である。

## 請求の範囲

1. 免疫刺激性オリゴヌクレオチドと $\beta$ -1,3-結合を有する多糖類との複合体から成る、免疫刺激剤。
- 5 2. 免疫刺激性オリゴヌクレオチドが、非メチル化 CpG モチーフを含む、請求項 1 の免疫刺激剤。
3. オリゴヌクレオチドのリン酸バックボーンが、ホスホロチオエートまたはホスホロジチオエート修飾されている、請求項 1 の免疫刺激剤。
4.  $\beta$ -1,3-結合を有する多糖類が、 $\beta$ -1,3-グルカンまたは $\beta$ -1,3-キシランである、請求項 1 の免疫刺激剤。
- 10 5.  $\beta$ -1,3-グルカンがシゾフィラン、カードラン、レンチナン、パーキマン、グリホラン、ラミナランまたはスクレログルカンから選ばれたものである、請求項 4 の免疫刺激剤。
6. 多糖類が、核酸結合性および／または細胞膜親和性官能基で修飾されている、請求項 1 の免疫刺激剤。
- 15 7. オリゴヌクレオチドと多糖類との複合体が、水素結合と疎水性相互作用を介して形成される三重螺旋構造状のものである、請求項 1 の免疫刺激剤。

第 1 図



## 第 2 図

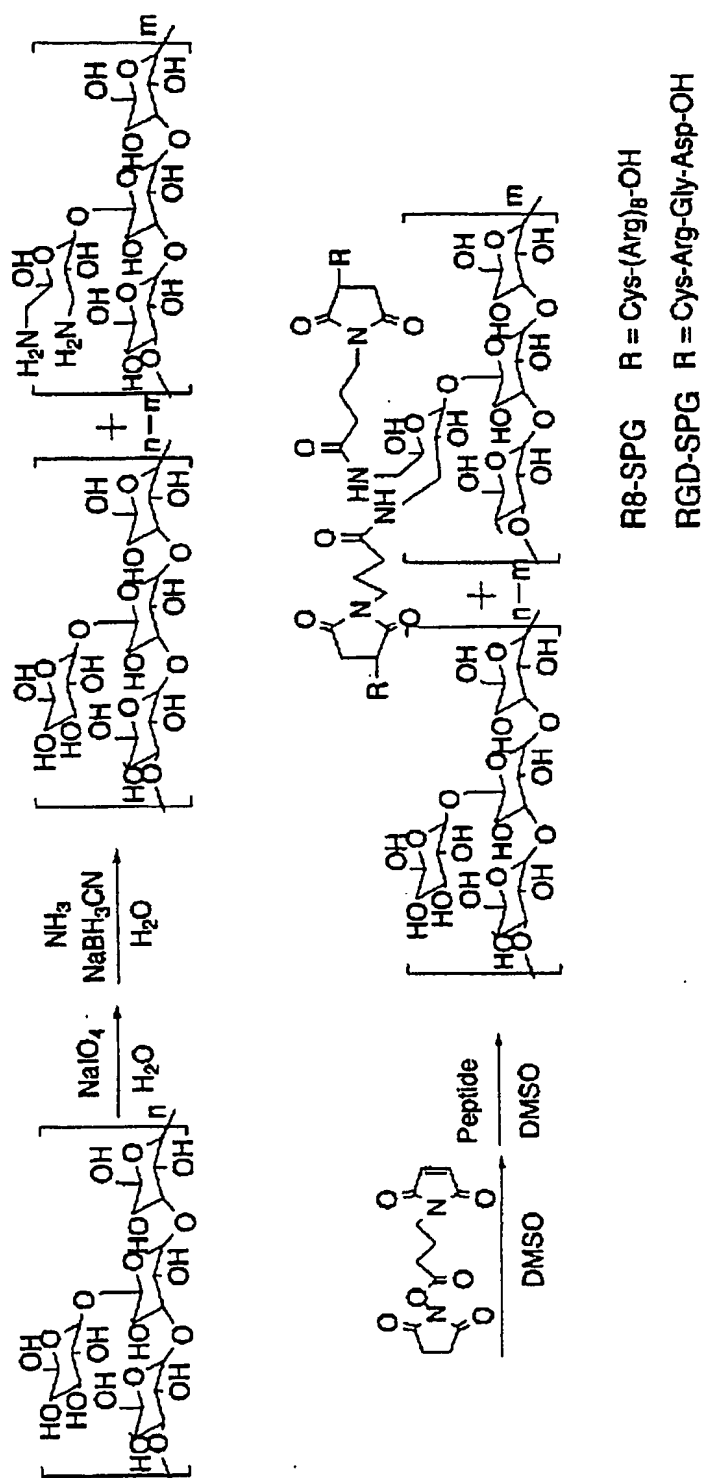
R8

 $\text{NH}_2\text{-Cys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-COOH}$ 

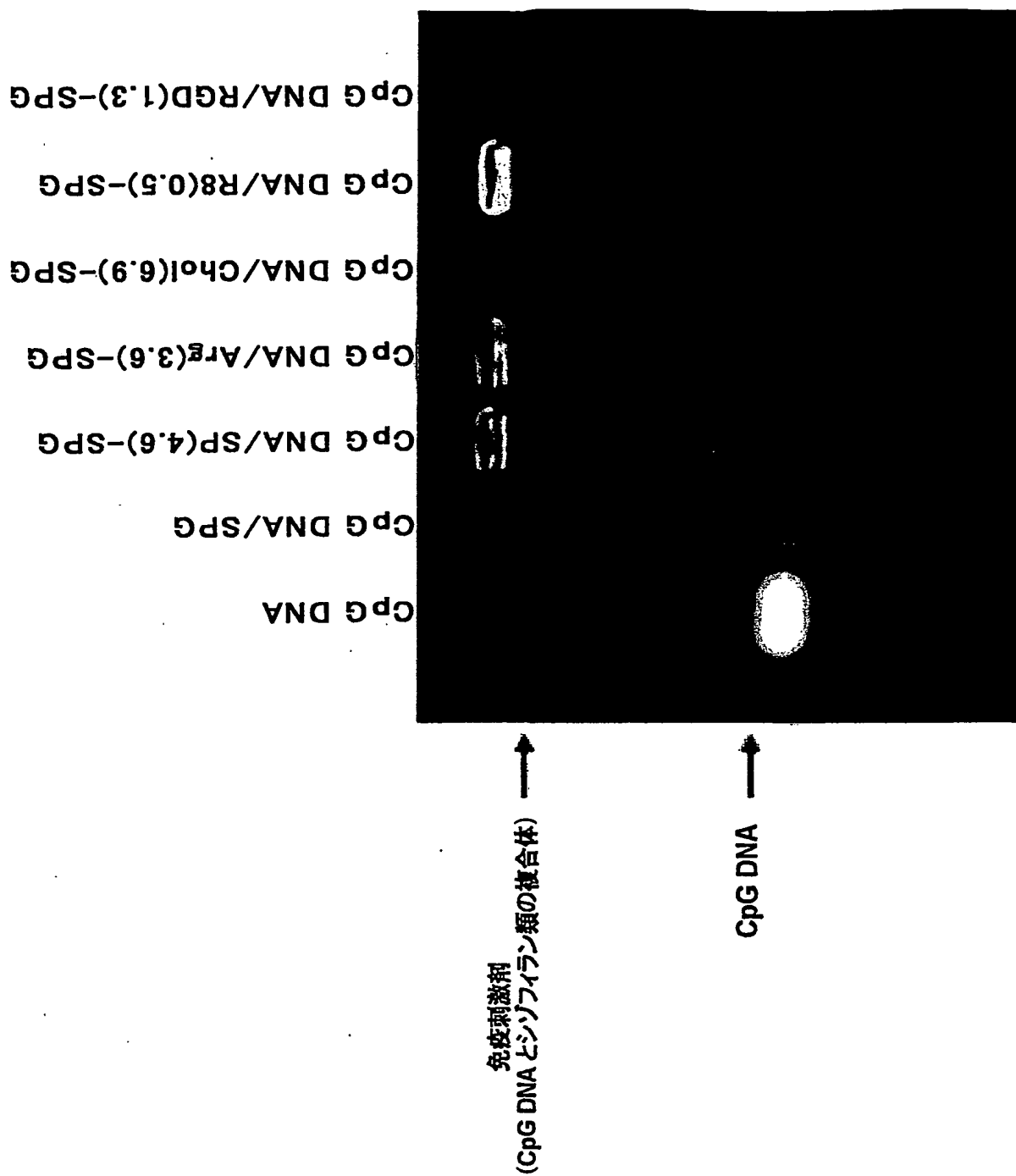
RGD

 $\text{NH}_2\text{-Cys-Arg-Gly-Asp-COOH}$

第 3 図

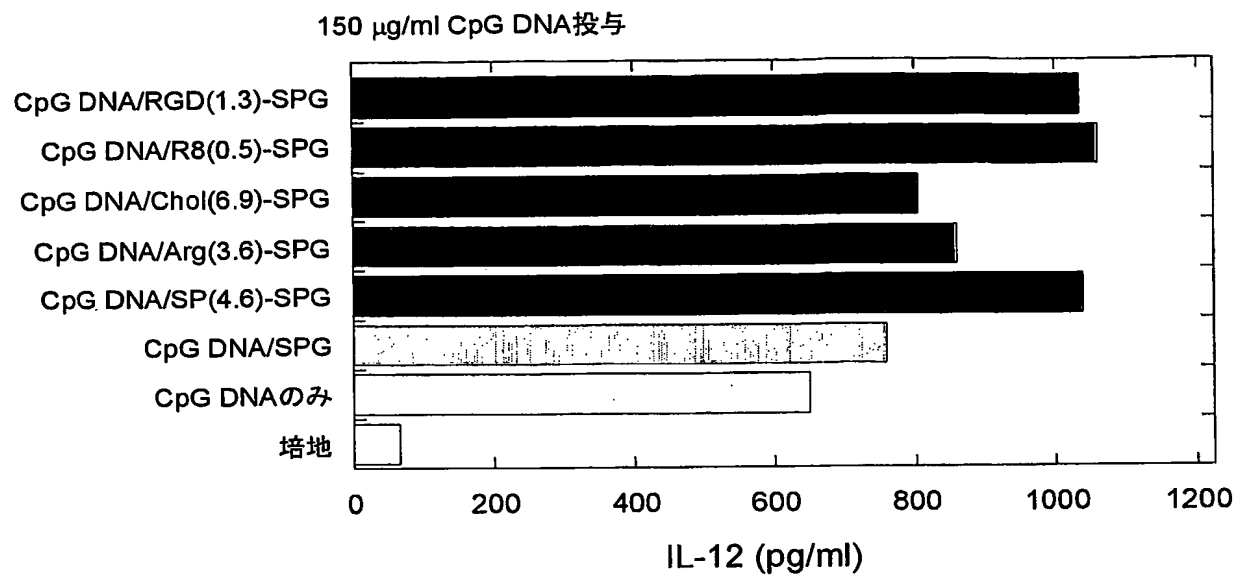


第 4 図

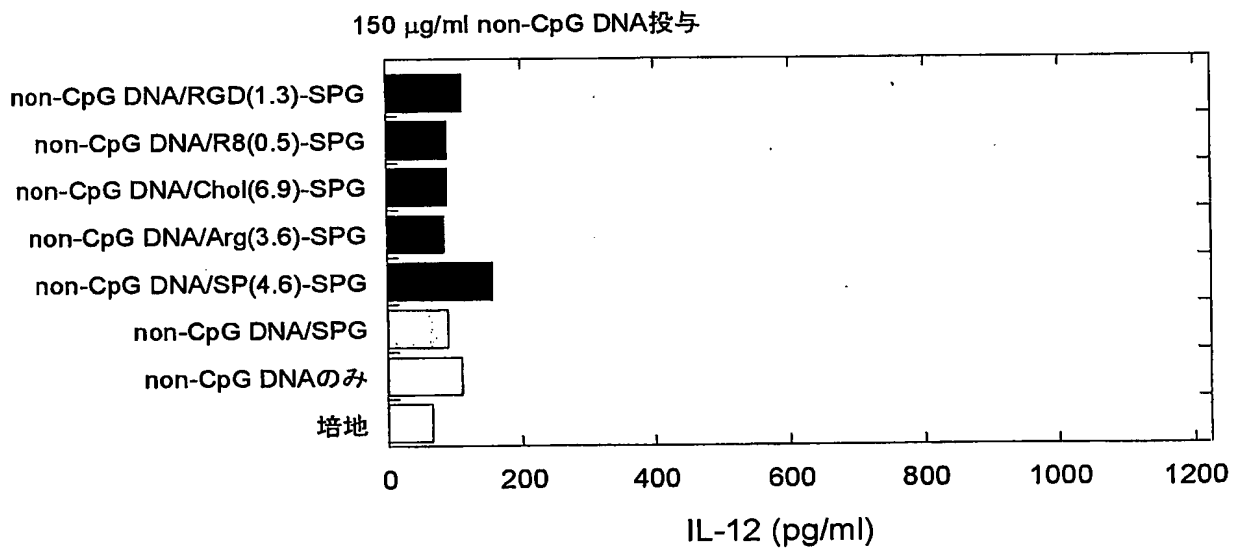




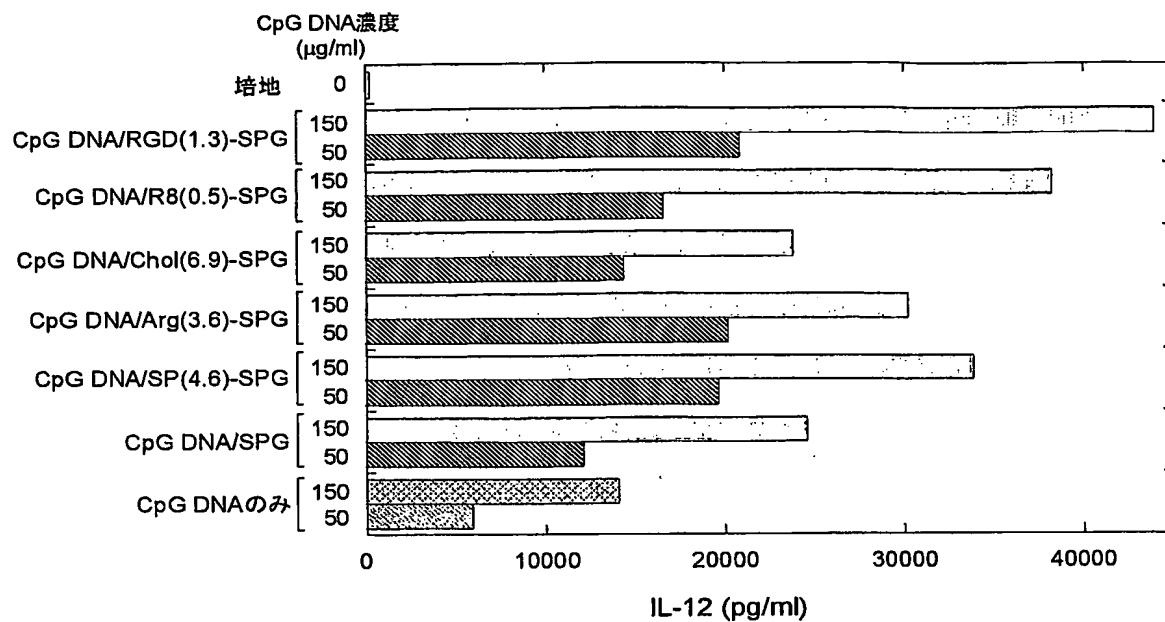
第 5 図



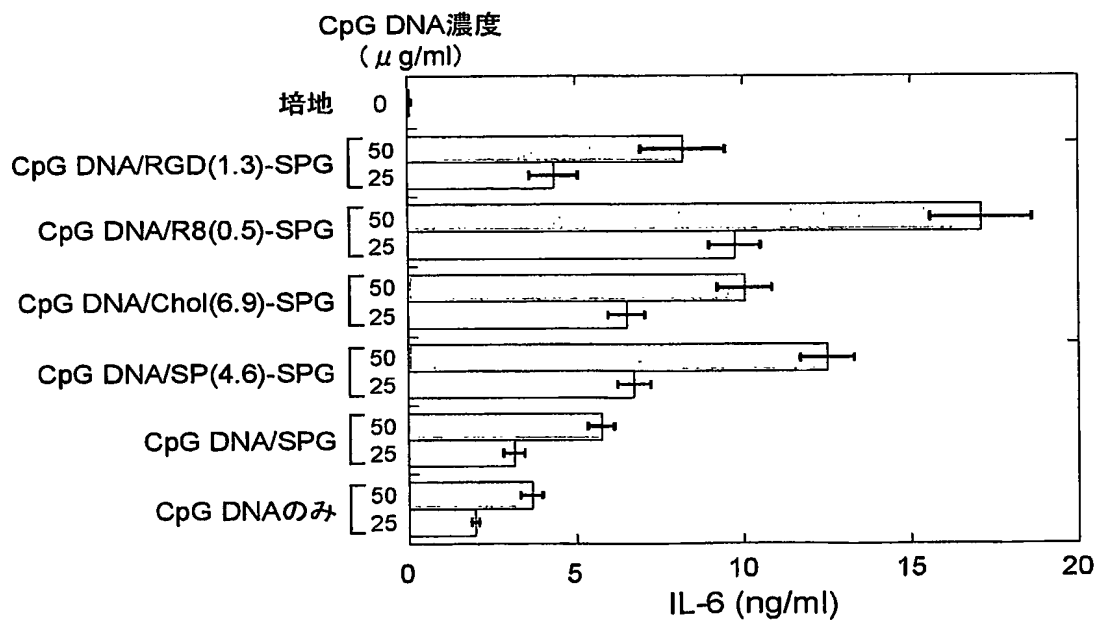
第 6 図



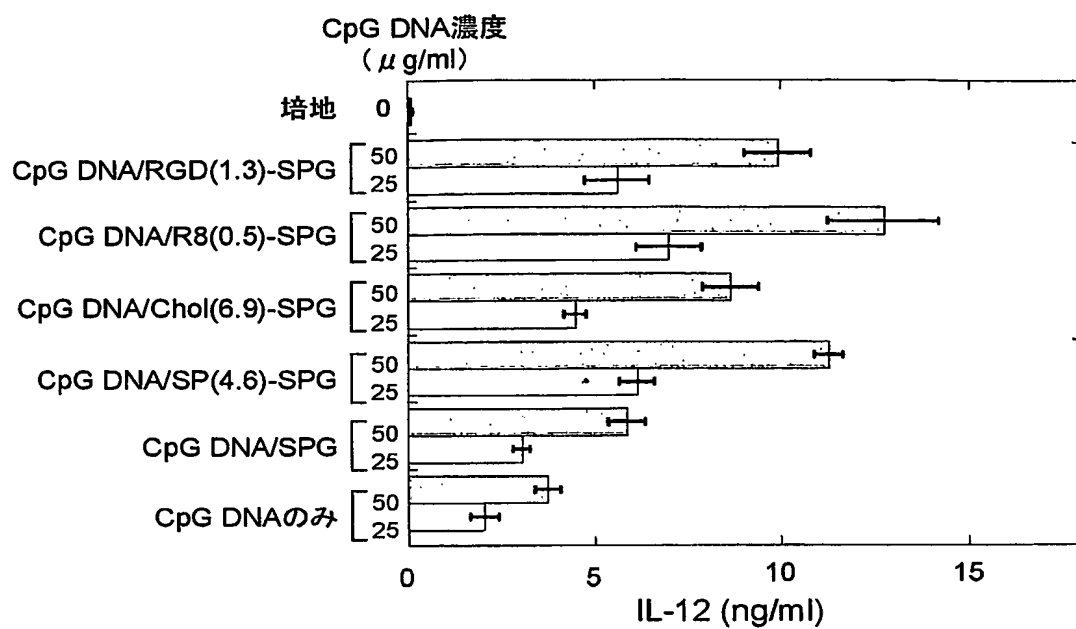
第 7 図



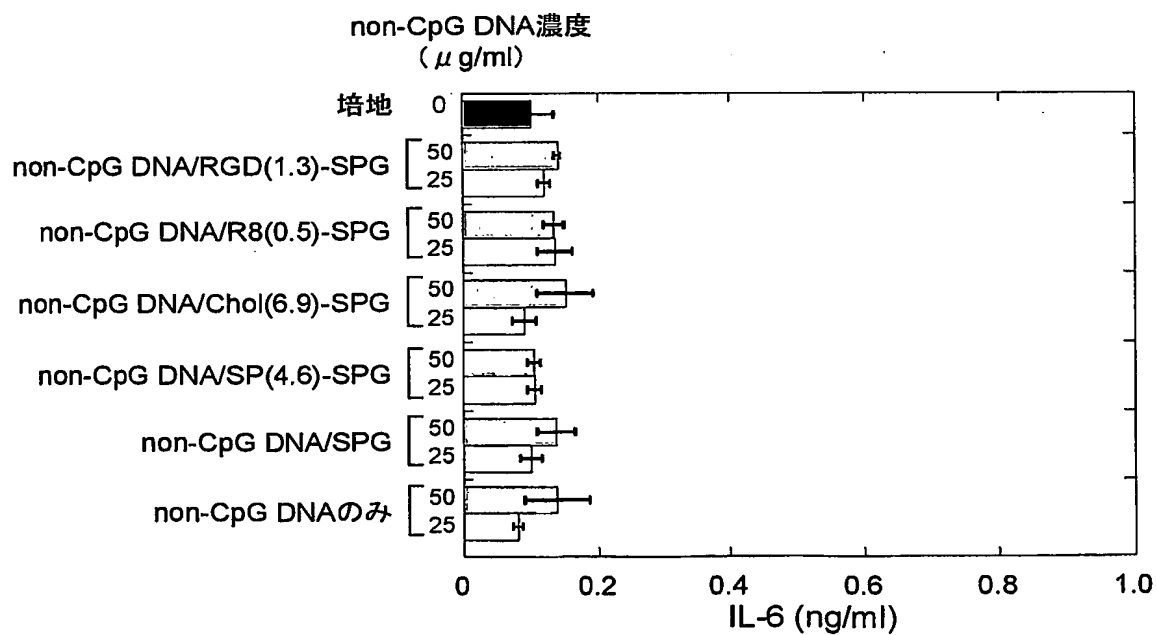
第 8 図



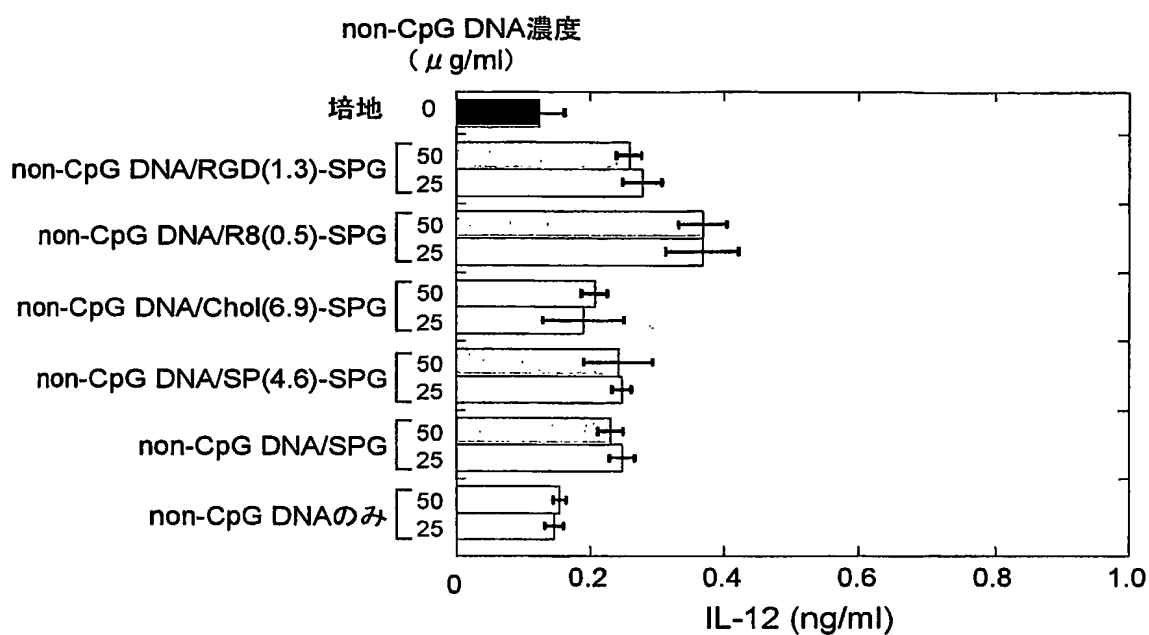
第 9 図



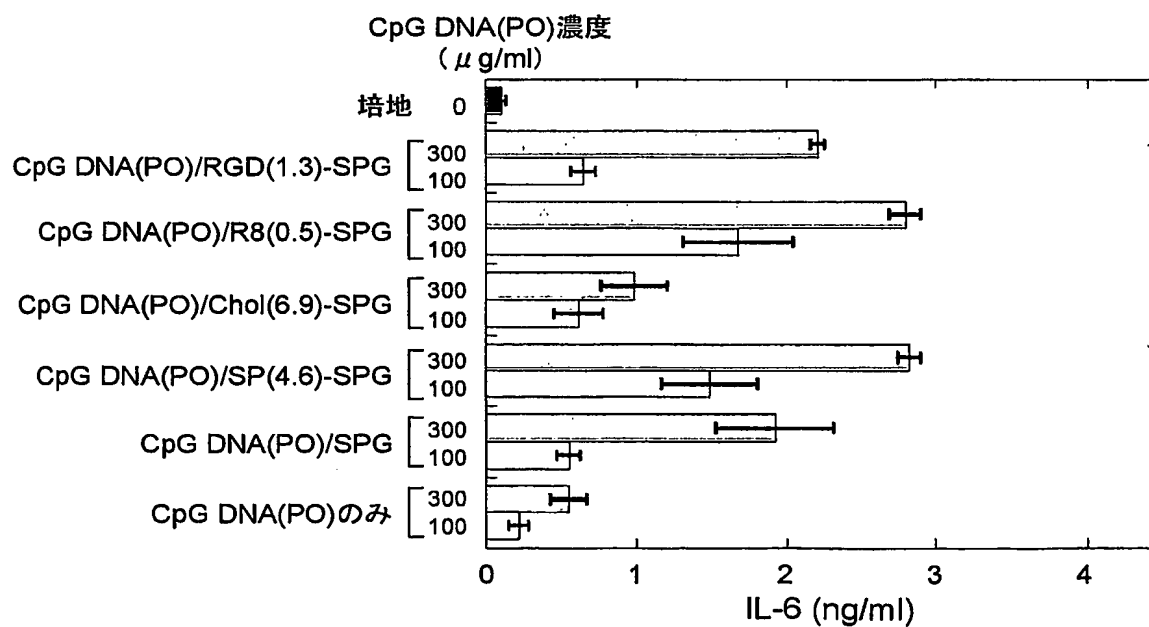
第 10 図



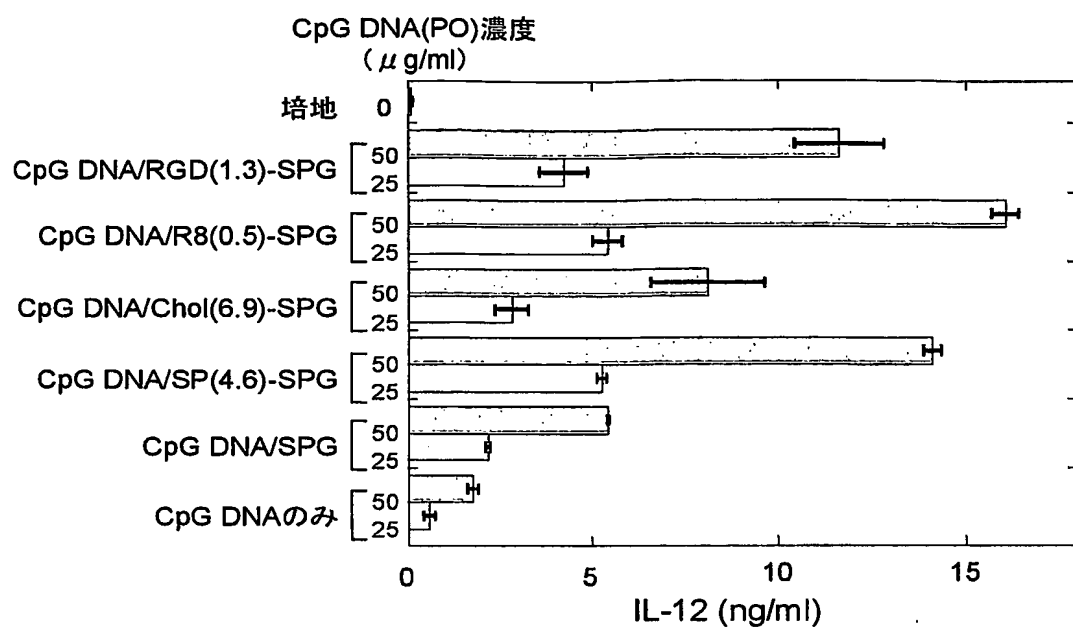
第 11 図



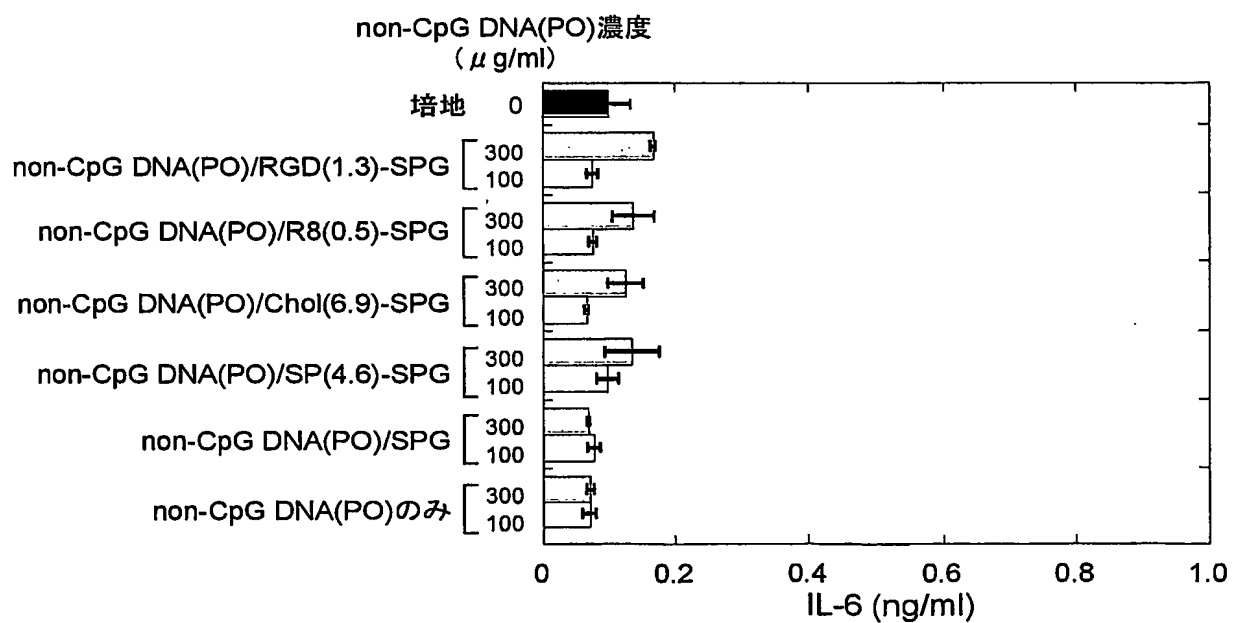
第 12 図



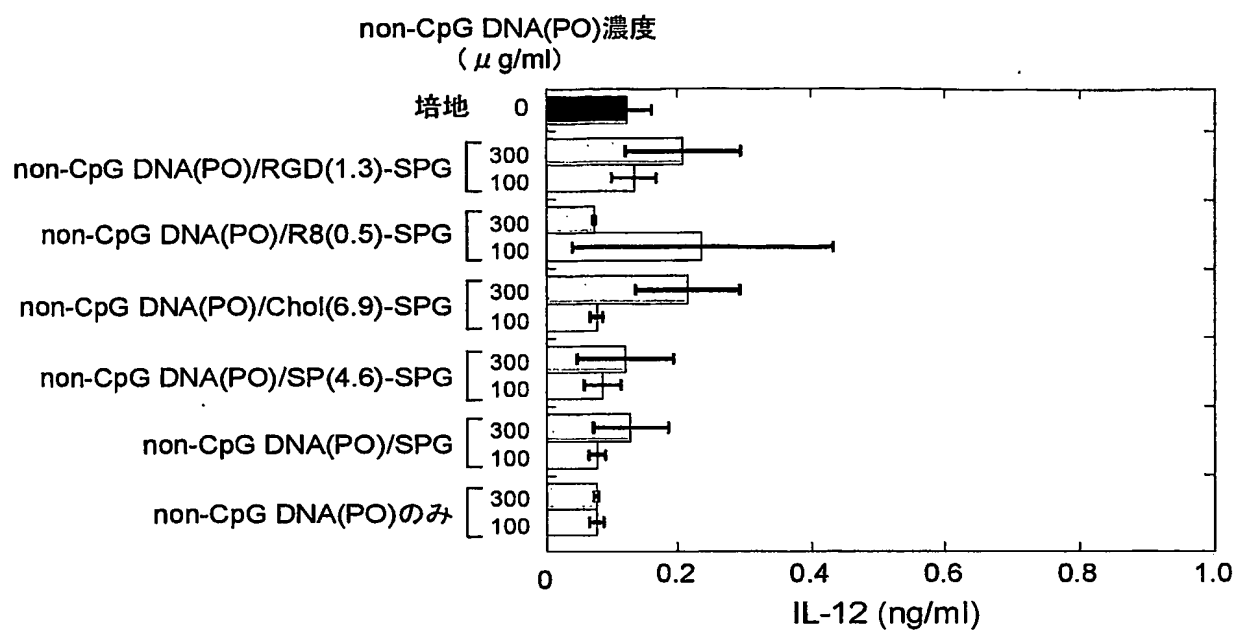
第 13 図



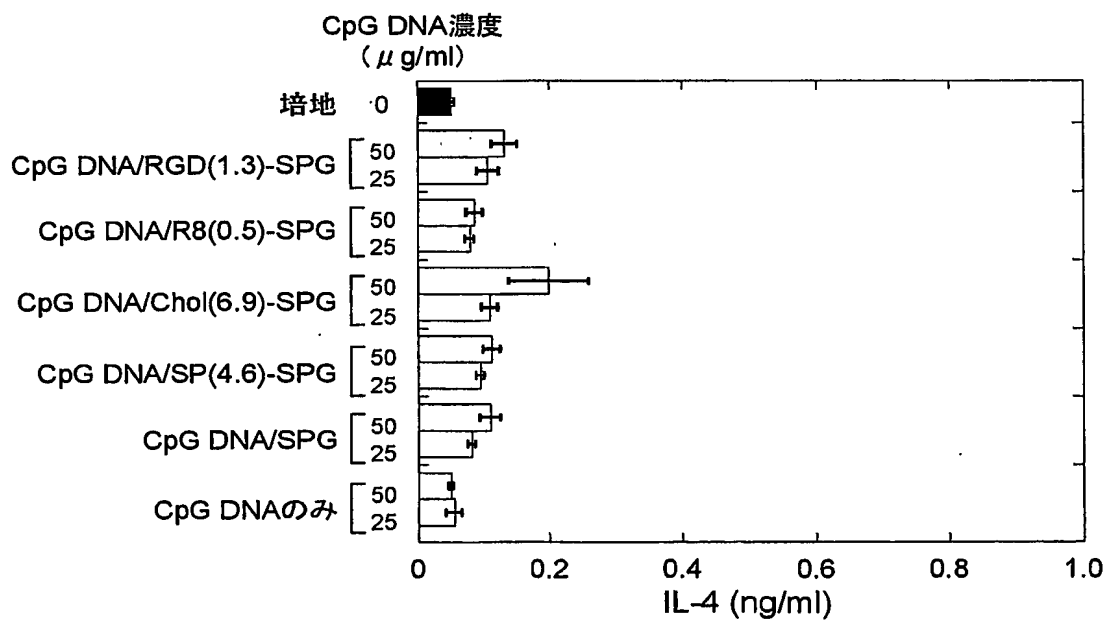
第 14 図



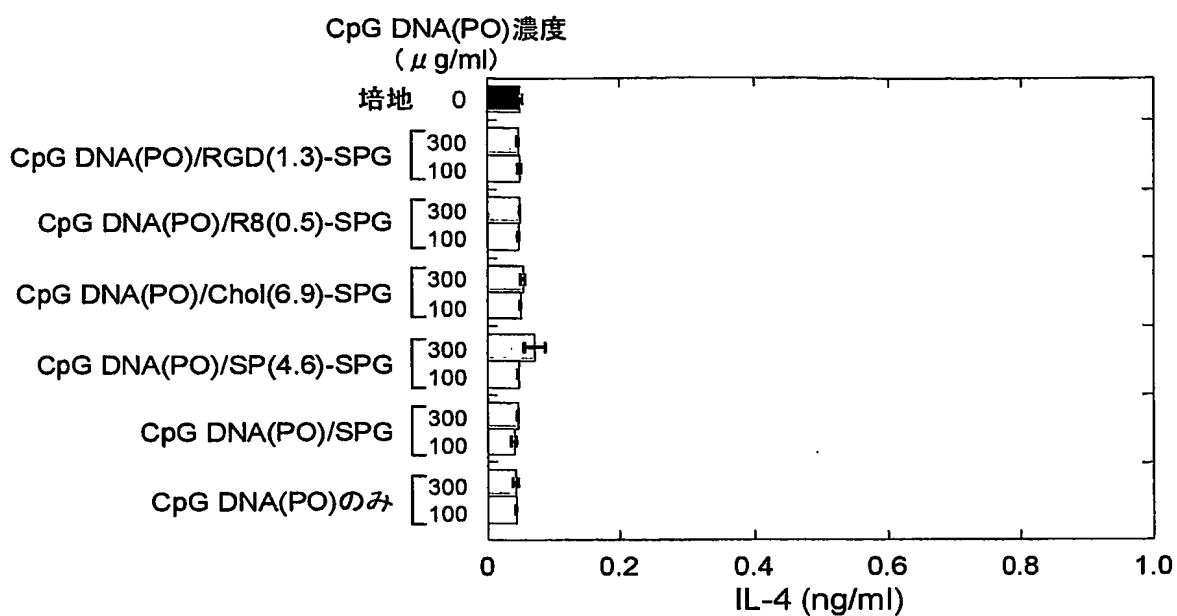
第 15 図



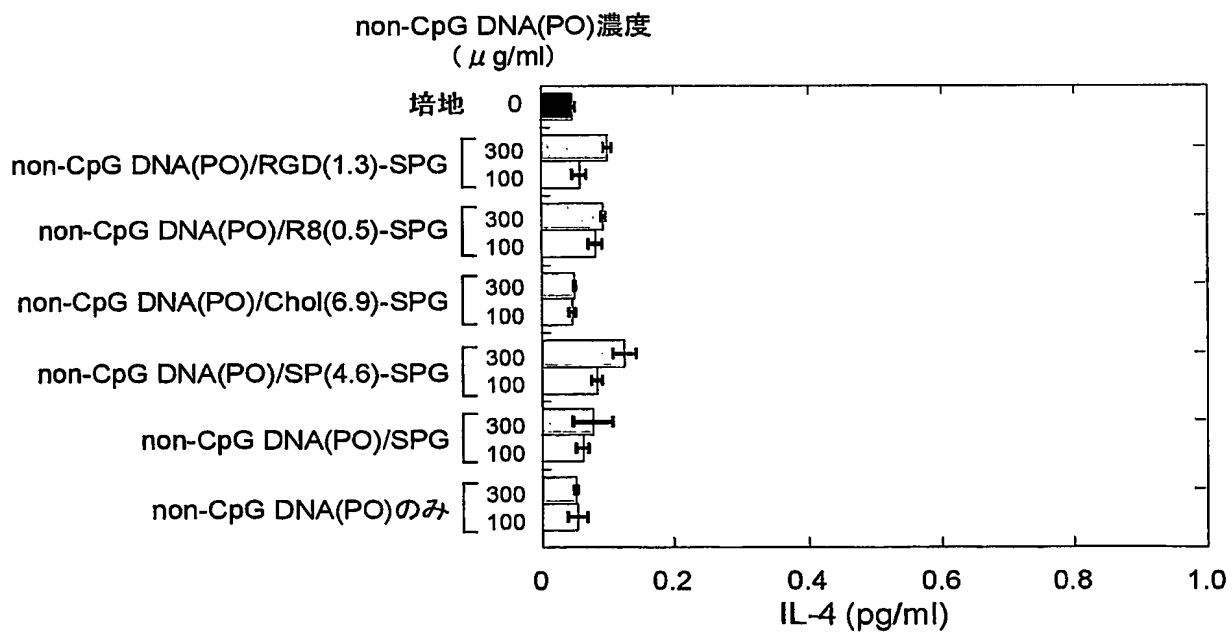
第 16 図



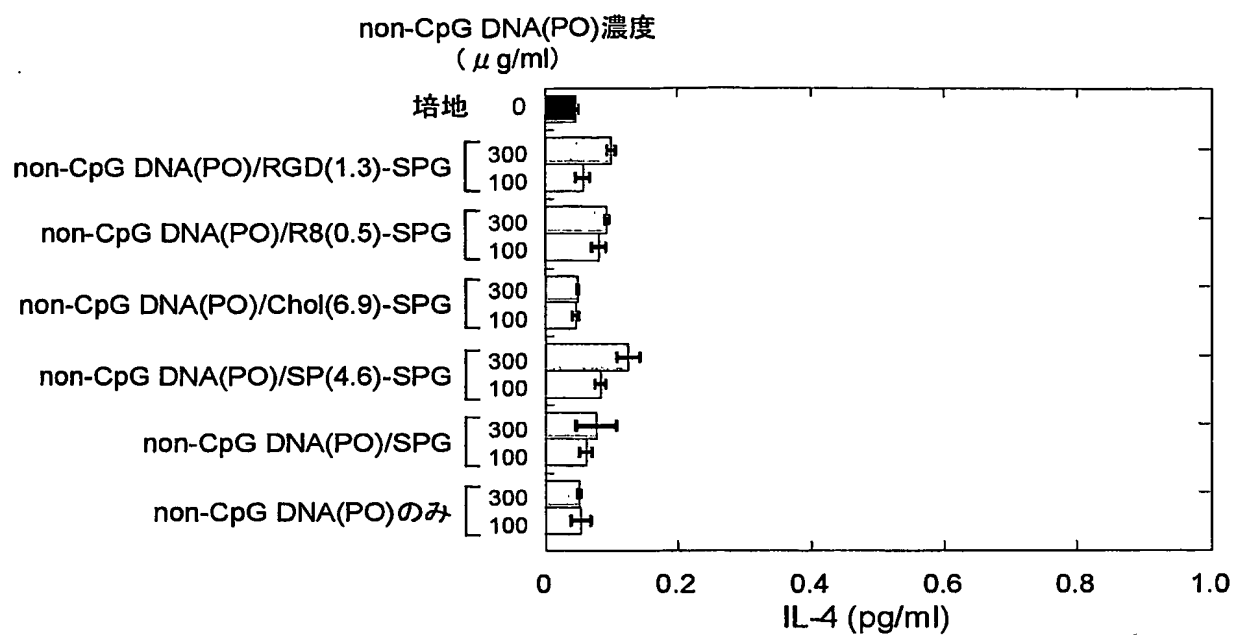
第 17 図



第 18 図



第 19 図





1/3

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Japan Science and Technology Agency

&lt;110&gt; MIZU Masami

&lt;120&gt; Immunostimulant

&lt;160&gt; 6

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial S-oligo nucleotide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Solid phase synthesized nucleotide

&lt;400&gt; 1

tccatgacgt tcctgatgct aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

2/3

<223> Solid phase synthesized peptide

<400> 2

Arg Gly Asp

1

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Solid phase synthesized peptide

<400> 3

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1

5

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial S-oligo nucleotide

<220>

<223> solid phase synthesized nucleotide

3/3

&lt;400&gt; 4

tccatgagct tcctgatgct aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial nucleotide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Solid phase synthesized nucleotide

&lt;400&gt; 5

tccatgacgt tcctgatgct aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial nucleotide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Solid phase synthesized nucleotide

&lt;400&gt; 6

tccatgagct tcctgatgct aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006793

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K31/7125, 48/00, 47/48, 47/36, A61P37/04, C08B37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K31/7125, 48/00, 47/48, 47/36, A61P37/04, C08B37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-503254 A (The Regents of the University of California), 13 March, 2001 (13.03.01), Full text; particularly, page 27, lines 18 to 23 & WO 98/16247 A1 & EP 930893 A1 & US 6610661 B1 & AU 9749921 A	1-7
Y	ARAMAKI Yukihiro et al., NADPH-Oxidase may Contribute to IL-12 Production in Macrophages Stimulated with CpG phosphorothioate Oligodeoxynucleotides, Biol.Pharm.Bull., (2002), Vol.25, No.3, pages 351 to 355	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
24 August, 2004 (24.08.04)Date of mailing of the international search report  
14 September, 2004 (14.09.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006793

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2002/072152 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 19 September, 2002 (19.09.02), Full text & EP 1369133 A1	1-7
Y	WO 2001/034207 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 17 May, 2001 (17.05.01), Full text & EP 1142591 A1 & US 2003/216346 A1	1-5, 7
Y	WO 96/14873 A2 (SRI INTERNATIONAL), 23 May, 1996 (23.05.96), Full text & WO 96/14873 A3	1-5, 7
Y	JP 09-504000 A (Jenner Technologies), 22 April, 1997 (22.04.97), Page 14, lines 9 to 18 & WO 95/04548 A1 & EP 721345 A1 & AU 9476312 A	1-7

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> A61K31/7125, 48/00, 47/48, 47/36, A61P37/04,  
C08B37/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> A61K31/7125, 48/00, 47/48, 47/36, A61P37/04,  
C08B37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN),  
REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2001-503254 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティー オブ カリフォルニア) 2001.03.13 全文、特に特許請求の範囲、第27頁18~23行目参照 &WO 98/16247 A1 &EP 930893 A1 &US 6610661 B1 &AU 9749921 A	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24.08.2004

国際調査報告の発送日

14.9.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳予子

4P

9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	ARAMAKI Yukihiro et al., NADPH-Oxidase may Comtribute to IL-12 Production in Macrophages Stimulated with CpG phosphorot hioate Oligodeoxynucleotides, Biol. Pharm. Bull., (2002), Vol. 25, No. 3, p. 351-355	1-7
Y	WO 2002/072152 A1 (科学技術振興事業団) 2002. 09. 19 全文参照 &EP 1369133 A1	1-7
Y	WO 2001/034207 A1 (科学技術振興事業団) 2001. 05. 17 全文参照 &EP 1142591 A1 &US 2003/216346 A1	1-5, 7
Y	WO 96/14873 A2 (SRI INTERNATIONAL) 1996. 05. 23 全文参照 &WO 96/14873 A3	1-5, 7
Y	JP 09-504000 A (ジェナー テクノロジーズ) 1997. 04. 22 第14頁9～18行目参照 &WO 95/04548 A1 &EP 721345 A1 &AU 9476312 A	1-7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**